

Gießen, 1960

Lane ✓
Each

Aus der Chemisch-Physiologischen Abteilung des
Veterinär-Physiologischen Institutes der
Justus Liebig-Universität zu Gießen

Leiter: Professor Dr. Dr. W. Boguth

**Die hämatologische
Geschlechtsbestimmung
bei Kaninchen und Weißen Ratten**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktor-Grades
bei der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

eingereicht von
Manfred Geßler
Tierarzt aus Zwickau

LANE LIBRARY. STANFORD UNIVERSITY

Gießen 1960

Aus der Chemisch-Physiologischen Abteilung des
Veterinär-Physiologischen Institutes der
Justus Liebig-Universität zu Gießen

Lelter: Professor Dr. Dr. W. Boguth

**Die hämatologische
Geschlechtsbestimmung
bei Kaninchen und Weißen Ratten**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktor-Grades
bei der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

eingereicht von
Manfred Geßler
Tierarzt aus Zwickau

Gießen 1960

Mit Genehmigung der Veterinär-Medizinischen Fakultät in Gießen

Dekan: Professor Dr. A. Schummer

Berichterstatter: Professor Dr. Dr. W. Boguth

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juli 1960

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
I. Einleitung	3
II. Aufgabestellung	6
III. Eigene Untersuchungen	6
A) Kaninchen	6
B) Weiße Ratte	9
IV. Untersuchungsergebnisse	
A) Kaninchen	11
B) Weiße Ratte	13
V. Auswertung	
A) Kaninchen	14
B) Weiße Ratte	19
VI. Schlußbetrachtung	
A) Kaninchen	32
B) Weiße Ratte	32
VII. Zusammenfassung	34
VIII. Literaturverzeichnis	36
Lebenslauf	39

I. EINLEITUNG.

Im Jahre 1949 fanden der kanadische Forscher B a r r und seine Mitarbeiter in den Ganglienzellkernen von weiblichen, seltener männlichen Katzen meist in unmittelbarer Nähe des Nukleolus oder dicht unter der Kernmembran gelegene feulgen-positive Verdichtungen. Sie gaben ihnen die Bezeichnung "nucleolar satellite". Das Vorhandensein oder Fehlen dieser Satelliten in den Zellkernen erlaubte eine Aussage über das Geschlecht des untersuchten Tieres. Bereits in ihrer ersten Veröffentlichung sprachen B a r r und B e r t r a m die Vermutung aus, daß es sich hierbei um das Heterochromatin der Geschlechtschromosomen handle.

B a r r und seine Mitarbeiter waren es auch, die ähnliche Untersuchungen an Zellen der menschlichen Epidermis durchführten. Auch hier fanden sie - überwiegend beim weiblichen Geschlecht - diese Nukleolus-Satelliten.

Da sich die Gewinnung von Zellmaterial für die oben genannten Untersuchungen schwierig gestaltet, lag es nahe, nach diesen "Geschlechtskörperchen" auch in leicht zu erreichendem Zellmaterial zu suchen.

D a v i d s o n und S m i t h erkannten 1954 in den neutrophilen Granulozyten die "drumsticks" = Trommelschlegel als die für das weibliche Geschlecht charakteristischen Geschlechtskörperchen der Blutzellen. Diese "drumsticks" sind rundliche bis ovale, feulgen-positive, dichte Kernexkreszenzen. Sie waren schon früher gesehen, aber nicht als geschlechtsspezifische Gebilde erkannt worden. So hat S c h i l l i n g in seiner "Praktischen Blutlehre" einen typischen Trommelschlegel abgebildet. S a n d k ü h l e r sah sie als pathologische Veränderungen bei Knochenmarksinsuffizienzen an; S c h l e i p und A l d e r waren der Auffassung, daß derartige Gebilde vorwiegend bei Leukämien auftraten.

Neben den "drumsticks" fanden D a v i d s o n und S m i t h "small clubs", das sind den Trommelschlegeln ähnliche, jedoch kleinere Gebilde. Sie zeigten sich vorwiegend beim männlichen Geschlecht. Eine dritte Gruppe bildeten die "sessile nodules",

sitzende Knotenformen. Seltener sahen sie "rackets" = Tennisschläger; Körperchen, die in Form und Größe den Trommelschlegeln ähneln, aber eine zentrale Aufhellung zeigen. Als fünfte Gruppe wurden schließlich die "minor lobes" genannt, größere Kernexkreszenzen, die durch zwei fädige Verbindungen mit dem übrigen Kernmaterial in Zusammenhang stehen.

Nach Davidson und Smith sollten die "drumsticks" nur beim weiblichen Individuum vorkommen. Tolksdorf, Romatowski, Saile und Wiedemann sowie Marberger und Nelson stellten aber bald klar, daß die "drumsticks" keine für das weibliche Geschlecht absolut spezifischen Kernanhangsgebilde sind, sondern daß lediglich der zahlenmäßige Faktor des Vorkommens bei den beiden Geschlechtern von Bedeutung ist.

1955 fanden Moore und Barr typische Geschlechtskörperchen auch in den Schleimhautepithelzellen sowie in fast allen menschlichen Körperzellen. Weiterhin wurde das Geschlechtschromatin in Chorionzellen gesehen.

In den letzten Jahren prüften zahlreiche Forscher die Ergebnisse von Barr und vor allem, der leichteren Technik halber, die von Davidson und Smith nach. Dabei ergaben sich für den Menschen im Wesentlichen übereinstimmende Befunde. Kosenow und Scupin stellten 1956 eine sogenannte "Kernanhangsformel" auf: von einem Probanden werden 500 segmentkernige neutrophile Granulozyten auf das Vorkommen von Kernexkreszenzen untersucht. Kosenow und Mitarbeiter berücksichtigen drei Gruppen von Exkreszenzen: Gruppe A = Trommelschlegel; Gruppe B = ungestielte Knoten- und Tropfenformen und Gruppe C = Zwischenformen, zu denen neben den "small clubs" von Davidson und Smith Stab-, Haken- und Fadenformen gerechnet werden. Die Kernanhangsformel lautet: $\frac{A+B}{C}$. Werte von $\frac{A+B}{C} > 0,4$ besagen, daß das untersuchte Blut von einem weiblichen, Werte von $\frac{A+B}{C} < 0,4$, daß es von einem männlichen Individuum stammt.

Obwohl die Arbeiten über das Geschlechtschromatin bei einem Tier begonnen hatten, befaßte sich die hämatologische Geschlechtsdi-

agnostik zunächst fast nur mit dem menschlichen Blut. T o l k s d o r f , R o m a t o w s k i , S a i l e und W i e d e - m a n n berichten als erste von der gelegentlichen Untersuchung des Blutaussstriches einer weiblichen Ratte. Die Blindauszählung ergab einen männlichen Befund.

1956 untersuchte Th. L ü e r s Kaninchenblutaussstriche. Sie fand auf 200 Granulozyten 2 - 24 "drumsticks" beim weiblichen und 0 - 5 "drumsticks" beim männlichen Geschlecht. 1957 fand P o r t e r eindeutige Geschlechtsunterschiede beim Hund und später sah Z a o r a l e k ebensolche beim Pferd. K r a f t untersuchte neben mehreren Zootieren Pferd, Rind, Schaf, Schwein, Hund und Katze. Bei diesen Haustieren zeigte sich, daß eine Geschlechtserkennung auf Grund der Leukozytenkernanhänge möglich ist.

Die Blutuntersuchungen an Vögeln brachten nach D i h l m a n n keine einwandfreien Ergebnisse, da maximal nur 20 % der Pseudo-eosinophilen für die Untersuchung geeignet waren. Immerhin fand D i h l m a n n bei der männlichen Taube, welche ja die Geschlechtschromosomen XX besitzt, also zum sogenannten Abraxas-Typ zählt, bis zu 8 Trommelschlegel auf 500 Zellen, während er bei weiblichen Tauben solche Anhänge nicht fand.

Größere Schwierigkeiten bereitet die Geschlechtsdiagnostik bei den Laboratoriumsnagern mit Ausnahme des Kaninchens, dessen erste Untersuchungsbefunde bereits erwähnt wurden. K r u e g e r und D i h l m a n n fanden bei weiblichen Meerschweinchen 5 - 11 und bei männlichen 2 - 12 "drumsticks" auf 200 Granulozyten. Th. und H. L ü e r s berichten von zwei weiblichen Meerschweinchen, die einen "drumstick"-Gehalt von ca. 7 % zeigten im Gegensatz zu zwei männlichen Meerschweinchen, deren Granulozyten zu ca. 2 % "drumsticks" zeigten. Nach den Arbeiten von G o d a u im Veterinär-Physiologischen Institut Gießen ist beim Meerschweinchen eine Geschlechtserkennung aus dem Blut mit Hilfe der Diskriminanz-Analyse möglich.

Für die Weiße Maus geben Th. und H. L ü e r s im Mittel 17,2% "drumstick"-tragende neutrophile Granulozyten beim weiblichen und 16,0 % beim männlichen Tier an. R u h r e n fand bei den weiblichen Tieren an 6 - 10 % und bei den männlichen Tieren an

4 - 10 % aller Neutrophilen "drumsticks". Eine Geschlechtsdifferenzierung erscheint nach diesen Angaben kaum möglich.

Von der Weißen Ratte liegen neben dem erwähnten Untersuchungsbefund eines weiblichen Tieres durch T o l k s d o r f und Mitarbeiter Ergebnisse von Th. und H. L ü e r s vor: bei vier weiblichen Ratten wurde kein "drumstick", bei fünf männlichen Tieren einmal ein solches Gebilde gefunden.

II. AUFGABESTELLUNG.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das Blut von Kaninchen und Weißen Ratten dahingehend zu untersuchen, mit welcher Sicherheit bei diesen Tieren eine hämatologische Geschlechtsbestimmung möglich ist. Auf Grund der Untersuchungsbefunde soll gegebenenfalls eine Trennformel aufgestellt, sowie nach Wegen gesucht werden, um die Einzeluntersuchung abzukürzen.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN.

Von je 25 weiblichen und je 25 männlichen Kaninchen und Weißen Ratten wurden möglichst dünne und gleichmäßige Blutausstriche angefertigt. Nach der Lufttrocknung wurden die Ausstriche nach der v. Pappenheimschen panoptischen Färbung gefärbt.

Unter Ölimmersion bei einer Vergrößerung von 1:1000 wurden je Tier 500 segmentkernige neutrophile Granulozyten auf das Vorhandensein von Kernexkreszenzen mikroskopisch untersucht. Die eigentlichen Untersuchungen wurden erst nach einer längeren Einarbeitungszeit durchgeführt. Diese Einarbeitungszeit erscheint in jedem Falle dringend geboten.

A) Kaninchen.

Beim Kaninchen war pro 500 Neutrophile eine Untersuchungszeit von ca. 2 bis 3 Stunden nötig. In die Untersuchung wurden nur

klare, völlig sichtbare und einwandfreie Leukozyten einbezogen. Die Einordnung der Kernexkreszenzen beim Kaninchen geschah nach folgendem Schema:

1.) Drumsticks = Trommelschlegel.

Als "drumsticks" wurden angesehen intensiv und homogen gefärbte, rundliche bis ovale, im Durchschnitt 1,35 my (1,04 - 1,76 my) lange und 1,03 my (0,72 - 1,28 my) breite Gebilde, die einen allseitig freien Rand besitzen und mit einer dünnen, mehr oder weniger langen Fadenbrücke mit dem übrigen Kern in Verbindung stehen. Ebenfalls zu den "drumsticks" wurden solche Anhänge gezählt, die ganz den obigen Anforderungen entsprechen, aber mit dem Kern nicht in direkter, sichtbarer Verbindung stehen.

2.) Sessile nodules = sitzende oder hängende Knoten- oder Tropfenformen.

Diese Gruppe umfaßt bereits eine größere Anzahl verschiedener, wenn auch ähnlicher Gebilde. Als "sessile nodules" wurden solche Exkreszenzen gewertet, die in Größe, Form und Färbung etwa den "drumsticks" entsprechen, aber keinen allseitig freien Rand besitzen, sondern mehr oder weniger weit dem Kern aufsitzen. Ein solches Körperchen wurde dann nicht zu den "drumsticks", sondern zu den "sessile nodules" gezählt, wenn der Übergang von Kern zu Anhang eben kein Faden mehr, sondern bereits ein Teil des Anhangskörperchens ist. Andererseits wurden solche Formen nicht mehr zu den "sessile nodules" gerechnet, wenn die Stelle des größten Durchmessers des Anhangs im Kern selbst liegt.

3.) Rackets = Tennisschläger.

Diese entsprechen in Form und Größe sowie in der fädigen Verbindung zum Kern ganz den "drumsticks". Sie unterscheiden sich von diesen durch eine zentrale Aufhellung ihrer Chromatinsubstanz.

4.) Small clubs = Zwischenformen nach Kosenow.

Die Abgrenzung dieser Gruppe geschah im Prinzip nach der

Einteilung von K o s e n o w . Zu den "small clubs" wurden gezählt:

a) rundliche, seltener ovale Anhänge, die erheblich kleiner als die "drumsticks" und zum Teil auch weniger intensiv gefärbt sind. Ihr Rand ist allseitig frei. Sie stehen mit dem übrigen Kern durch eine meist gerade verlaufende fädige Brücke in Verbindung. Diese Brücke kann fehlen.

b) Ebensolche Körperchen wie unter a), welche aber dem Kern mehr oder weniger weit aufsitzen. Für die Beurteilung der Grenzfälle gilt das bei den "sessile nodules" Gesagte.

c) Stabformen, das sind verschieden lange und verschieden starke stabförmige Anhängsel, die mit dem Kern in direkter Verbindung stehen.

d) Hakenformen, das sind ähnliche Gebilde wie unter c), die aber, meist am distalen Ende, eine stärkere oder schwächere Abknickung zeigen.

e) Fadenformen, das sind dünne, meist gebogene Exkreszenzen.

5.) Minor lobes = kleine Lappen.

Als "minor lobes" wurden solche Formen berücksichtigt, die in der Größe etwa den "drumsticks" entsprechen, jedoch unterschiedliche Form und Färbung zeigen und durch zwei Chromatinfäden mit dem übrigen Kern verbunden sind.

Alle sonstigen Gebilde, die sich nicht ohne Zwang in das obige Schema einfügen ließen, insbesondere solche Anhänge, die ohne Entscheidungsmöglichkeit an der Grenze zwischen zwei Gruppen lagen, wurden nicht mitgezählt: der Granulozyt, welcher solche Exkreszenzen zeigte, ebenfalls nicht. "Drumsticks", die wahrscheinlich solche waren, bei deren Beurteilung sich aber Zweifel ergaben, wurden in die Zähltablelle als fragliche "drumsticks" übernommen. Bei der endgültigen Auswertung fanden sie keine Berücksichtigung als "drumsticks".

Bei der Zählung wurde die genaue Reihenfolge der Granulozyten mit Trommelschlegel notiert. Weiterhin wurde nach jeweils 100 Leukozyten die Anhangszählung neu begonnen.

B) Weiße Ratte.

Erheblich größere Schwierigkeiten bereitete die Untersuchung der Granulozyten der Weißen Ratte. In der Regel waren die Blutausstriche sehr Leukozyten-arm, so daß die Durchmusterung von 500 segmentkernigen neutrophilen Granulozyten 2 bis 10 Stunden in Anspruch nahm. Oft mußten zwei Ausstriche untersucht werden, um 500 Leukozyten zu finden. Das Anfertigen dickerer Ausstriche erwies sich als wertlos, da dann durch die zu dichte Lagerung der Zellen die Innenstrukturen nicht mehr gut zu erkennen waren.

Wesentlich folgenschwerer war die während der Einarbeitungszeit getroffene Feststellung, daß bei der Weißen Ratte den "drumsticks" des Menschen und des Kaninchens entsprechende Kernexkreszenzen offensichtlich nicht vorhanden waren. Es war nun die Entscheidung zu fällen, ob die Untersuchung davon ausgehen sollte, daß "drumsticks" überhaupt nicht vorhanden waren - damit wäre die Chance, zu einer Geschlechtsdiagnose zu gelangen, von Anfang an äußerst gering gewesen. Die andere Möglichkeit, die sich darbot, war, innerhalb der vorliegenden Kernanhänge eine neue Aufteilung in "Ratten-drumsticks" und die übrigen Gruppen vorzunehmen. Da einerseits zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen noch keine Arbeiten über die hämatologische Geschlechtsbestimmung bei der Ratte vorlagen (von der einen erwähnten Untersuchung durch T o l k s d o r f und Mitarbeiter abgesehen), und da andererseits ja doch versucht werden sollte, eine Methode der Geschlechtsdiagnose zu finden, wurde für die Ratte ein neues Einteilungsschema aufgestellt. Danach wurden unterschieden:

1.) Drumsticks = Trommelschlegel.

Als solche wurden gezählt homogen und mehr oder weniger intensiv gefärbte, meist ovale, seltener rundliche, im Durchschnitt 0,81 my (0,60 - 1,16 my) lange und 0,63 my (0,44 - 0,80 my) breite Anhänge, deren scharfer Rand allseitig frei ist. Mit dem übrigen Kern stehen diese "drumsticks" meist in fädiger Verbindung. Anhänge, die ohne sichtbare Verbindung frei im Plasma liegen, aber den sonstigen Anforderun-

gen eines "drumstick" genügen, wurden ebenfalls als solche gewertet.

- 2.) Sessile nodules = sitzende oder hängende Knoten- oder Tropfenformen.

Die Definition dieser Gebilde ist die gleiche wie die der "sessile nodules" beim Kaninchen. Die Größe der Gebilde entspricht jedoch der der "Ratten"-Trommelschlegel.

- 3.) Rackets = Tennisschläger.

Für sie gilt ebenfalls die Definition der "rackets" des Kaninchens; die Größenverhältnisse sind die gleichen wie bei den "Ratten-drumsticks".

- 4.) Small clubs = Zwischenformen nach Kosenow.

Die Einordnung erfolgte nach dem bei den Kaninchen genannten Schema. Die obere Grenze der Größe der eigentlichen "small clubs" liegt entsprechend der Definition der "Ratten-drumsticks" erheblich unter der Größe der "small clubs" beim Kaninchen.

- 5.) Minor lobes = kleine Lappen.

Für sie gilt die bei den Kaninchen gegebene Definition.

Die Untersuchung selbst erfolgte im übrigen nach den gleichen Grundsätzen wie beim Kaninchen. Es ist verständlich, daß der Anteil der fraglichen bzw. überhaupt nicht registrierbaren Exkreszenzen durch das Aneinanderrücken der Größen von "drumsticks" und "small clubs" wesentlich höher als beim Kaninchen war.

IV. UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE.

A) Kaninchen.

Anzahl der an 500 segmentkernigen neutrophilen Granulozyten je Tier gefundenen verschiedenen Anhangsgebilde:

W	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₅	M	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₅
K-o1	31	12	7	30	7	K-51	1	2	1	44	5
K-o2	23	11	5	42	5	K-52	-	2	-	43	-
K-o3	28	30	11	31	3	K-53	-	1	-	27	-
K-o4	44	29	15	24	3	K-54	-	1	-	25	-
K-o5	42	23	16	31	4	K-55	-	-	-	23	2
K-o6	36	42	8	24	3	K-56	-	2	-	28	1
K-o7	30	36	11	33	3	K-57	-	2	-	16	2
K-o8	42	33	11	27	6	K-58	11	14	3	34	3
K-o9	48	35	10	28	3	K-59	-	5	-	25	-
K-10	36	36	9	28	3	K-60	-	2	-	21	-
K-11	37	31	9	23	5	K-61	2	1	-	16	-
K-12	51	37	13	18	4	K-62	-	4	-	26	1
K-13	32	27	6	19	7	K-63	-	2	-	38	2
K-14	27	21	7	19	7	K-64	-	2	-	25	1
K-15	54	37	11	16	7	K-65	-	2	-	30	2
K-16	52	35	7	30	6	K-66	1	3	-	26	-
K-17	57	29	11	18	11	K-67	1	2	-	23	2
K-18	61	27	7	13	6	K-68	-	3	-	24	-
K-19	30	28	6	20	2	K-69	-	-	-	26	-
K-20	59	46	11	27	7	K-70	-	3	-	17	4
K-21	39	24	5	23	3	K-71	1	3	-	22	4
K-22	34	36	7	16	7	K-72	1	3	-	22	1
K-23	45	37	18	25	7	K-73	-	8	1	18	1
K-24	34	22	11	18	7	K-74	-	9	-	16	1
K-25	37	34	11	25	8	K-75	1	-	-	16	-

W = Weibliche Tiere

M = Männliche Tiere

x₁ = drumsticks ; x₂ = sessile nodules

x₃ = rackets ; x₄ = small clubs

x₅ = minor lobes

Segmentkernige neutrophile Granulozyten (bei den weiblichen Kaninchen K-01 bis K-25 unter den untersuchten Granulozyten 1 - 100, bei den männlichen Kaninchen K-51 bis K-75 unter allen untersuchten Granulozyten 1 - 500), die einen "drumstick" zeigten:

K-01	16,22,80,97.
K-02	27,63,69.
K-03	25,36,60,69,86,93.
K-04	2,13,26,27,40,43,51,61,62,69,75,81,94.
K-05	10,16,24,45,49,53,61,63,83,86,95,96.
K-06	37,47,48,53,66,85.
K-07	27,52,53,55,57,77,90,91,97.
K-08	1,13,14,31,35,77,88,96.
K-09	2,17,23,40,50,84,87,98.
K-10	7,29,33,81,91,93,96.
K-11	25,28,34,57,73,74,87,90,100.
K-12	17,28,30,35,59,64,72,95.
K-13	34,45,48,65,78,92.
K-14	15,21,40,41,81.
K-15	1,2,4,13,14,33,48,59,61,66,73,81,89,95.
K-16	2,7,21,25,41,44,50,56,62,64,70,74.
K-17	7,21,32,35,37,52,61,69,70,84,99.
K-18	10,22,28,37,40,50,56,58,59,65,71,73,80,100.
K-19	2,22,26,46,51,53.
K-20	8,11,49,56,58,62,64,71,80.
K-21	6,12,26,33,40,60,70,75,89,96.
K-22	6,42,47,56,83,92.
K-23	14,16,33,34,41,62,68,86,94.
K-24	16,38,39,42,43,65,100.
K-25	15,20,47,48,54,76,100.

K-51	303.	; K-52 bis K-57	-
K-58	4,77,113,167,207,215,225,311,436,475,483.		
K-59 und K-60	-	; K-61	171,423.
K-62 bis K-65	-	; K-66	481.
K-67	25.	; K-68 bis K-70	-
K-71	193.	; K-72	17.
K-73 und K-74	-	; K-75	420.

B) Weiße Ratte.

Anzahl der an 500 segmentkernigen neutrophilen Granulozyten je Tier gefundenen verschiedenen Anhangsgebilde:

W	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₅	M	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₅
R-01	8	25	-	67	10	R-51	4	7	-	59	1
R-02	8	23	-	29	1	R-52	1	11	-	54	-
R-03	7	21	-	30	5	R-53	2	20	-	54	-
R-04	7	21	1	51	6	R-54	2	10	-	55	5
R-05	8	23	1	38	2	R-55	3	18	-	63	3
R-06	11	15	-	32	1	R-56	4	10	-	42	-
R-07	13	28	-	24	2	R-57	3	5	-	34	4
R-08	16	18	-	24	3	R-58	2	8	1	56	5
R-09	8	19	-	32	4	R-59	3	4	-	51	4
R-10	9	23	-	31	1	R-60	2	6	-	45	1
R-11	7	19	-	32	2	R-61	6	3	-	39	1
R-12	7	14	-	28	2	R-62	2	7	-	42	2
R-13	9	15	-	49	4	R-63	7	10	1	61	2
R-14	2	10	-	17	3	R-64	2	6	1	38	2
R-15	4	8	-	23	-	R-65	4	6	-	57	-
R-16	5	6	-	34	2	R-66	1	7	-	23	1
R-17	6	6	-	20	2	R-67	3	8	-	37	1
R-18	5	12	-	23	4	R-68	2	14	-	51	-
R-19	11	18	-	52	5	R-69	1	7	-	32	-
R-20	4	14	-	30	1	R-70	3	8	-	44	-
R-21	5	13	-	32	2	R-71	1	5	1	34	-
R-22	6	14	-	27	-	R-72	1	3	-	35	3
R-23	5	16	1	40	-	R-73	2	7	-	31	-
R-24	6	13	1	28	1	R-74	2	12	-	52	1
R-25	10	25	-	38	-	R-75	2	7	-	46	2

W = Weibliche Tiere

M = Männliche Tiere

x₁ = drumsticks ; x₂ = sessile nodules

x₃ = rackets ; x₄ = small clubs

x₅ = minor lobes

V. AUSWERTUNG.

A) Kaninchen.

Die "drumstick"-Werte beim Kaninchen sind so eindeutig in eine weibliche und eine männliche Gruppe, die vollständig voneinander getrennt sind, aufgeteilt, daß bei der Geschlechtsdiagnose eine Berücksichtigung der "drumsticks" allein völlig ausreicht. Sehr einfach ist es, auf Grund des weiblichen Minimum-Wertes und des männlichen Maximum-Wertes einen Grenzwert zu finden. Wenn wir das Präparat K-58, welches mit 11 "drumsticks" bei 500 Neutrophilen sehr aus der Reihe fällt, nicht berücksichtigen, ergibt sich als einfache Trennformel für das Kaninchen

$$X > 12,5 = \text{weiblich,}$$

$$X < 12,5 = \text{männlich.}$$

Ein Herabsetzen der Zahl der untersuchten Leukozyten, etwa auf 100, würde die Zählarbeit zwar erleichtern, aber die Fehlerquote erhöhen. Hier nun bietet die Durchführung einer Sequenz-Analyse nach A. W a l d die Möglichkeit einer sicheren Trennung bei möglichst geringer Anzahl zu untersuchender Granulozyten. Das Wesen der Sequenz-Analyse, einem eleganten mathematisch-statistischen Verfahren, beruht darauf, daß die Untersuchung nur bis genau zu jenem Punkte durchgeführt wird, an dem die Entscheidung zwischen zwei Möglichkeiten - bei gewünschter Sicherheit - eben getroffen werden kann. In unserem Falle werden also geradesoviel Granulozyten, und nicht einer mehr, untersucht, als zur Geschlechtsaussage notwendig ist.

Die Sequenz-Analyse ist durch Übertragung auf ein Koordinatensystem zudem äußerst anschaulich und leicht zu handhaben. Im rechten oberen Quadranten des Koordinatensystems wird durch zwei parallel verlaufende Geraden ein bestimmtes Gebiet begrenzt. Die untere Gerade schneidet die y-Achse im negativen, die obere Gerade kreuzt die y-Achse im positiven Bereich. Der O-Punkt, zugleich der Ausgangspunkt jeder Untersuchung liegt innerhalb dieses nach oben und nach rechts begrenzten neutralen Streifens. Auf der y-Achse werden die charakteristischen Merkmale, hier die "drumsticks", auf der x-Achse die möglichen und die tatsächlichen Merkmalsträger, in diesem Falle also die untersuchten neu-

trophilen Granulozyten aufgetragen. Bei der Untersuchung verläuft die fortlaufende Untersuchungslinie dergestalt, daß nach jedem untersuchten Leukozyten ein Schritt nach rechts und nach jedem gefundenen "drumstick" ein Schritt nach oben getan wird. Die Untersuchung ist beendet, wenn die treppenartige Linie das neutrale Feld innerhalb der beiden Geraden verläßt. Ein Austreten nach oben besagt im vorliegenden Falle, daß das untersuchte Blut von einem weiblichen Kaninchen stammt, ein Austreten nach rechts, daß es von einem männlichen Tier genommen wurde.

Die Formel für die trennenden Geraden lautet:

$$y = a \cdot x + b .$$

Dabei ist a die Steigung und b der y-Abschnitt der Geraden. Da b einen $\pm$ Wert besitzt, ergeben sich aus dieser Formel zwei parallel verlaufende Geraden.

Zunächst werden die beiden "drumstick"-Mittelwerte bestimmt nach der Formel:

$$\bar{x} = x_0 + \frac{S(d)}{n} .$$

Daraus ergeben sich:

$$\bar{x}_W = 40,36 \quad \text{und} \quad \bar{x}_M = 0,76 ,$$

aus denen sich

$$p_W = \frac{\bar{x}_W}{500} = 0,08072 \quad \text{und}$$

$$p_M = \frac{\bar{x}_M}{500} = 0,00152 \quad \text{sowie}$$

$$q_W = 1 - p_W = 0,91928 \quad \text{und}$$

$$q_M = 1 - p_M = 0,99848$$

errechnen lassen.

Die Steigung a läßt sich aus folgender Formel bestimmen:

$$a = \frac{\log \frac{q_M}{q_W}}{\log \frac{p_W \cdot q_M}{p_M \cdot q_W}} = 0,02033 .$$

Für den y-Abschnitt b der Geraden lautet die Formel:

$$b = \frac{\log \frac{1 - \alpha}{\beta}}{\log \frac{p_W \cdot q_M}{p_M \cdot q_W}} = \pm 1,1075 .$$

$\alpha = 0,01$ und $\beta = 0,01$ sind hierin die beiden eingegangenen Risiken, das heißt, bei dieser Methode ist im vorliegenden Falle mit einer Fehlerquote von 1 % zu rechnen.

Die beiden Geraden sind somit definiert als

$$y_1 = 0,02033 + 1,1075 \quad \text{und}$$

$$y_2 = 0,02033 + 1,1075 .$$

Auf Seite 18 sind die beiden Geraden im Koordinatensystem dargestellt. Für die Präparate K-18, K-58 und K-67 als Beispiele ist die Sequenz-Analyse in ihrer Anwendung dort veranschaulicht worden.

Die Tabelle auf Seite 17 gibt an, beim wievielten Granulozyten der untersuchten Kaninchen die Zählung bei Anwendung der Sequenz-Analyse beendet ist.

Die Sequenz-Analyse erweist sich danach als ein optimales Verfahren zur hämatologischen Geschlechtsbestimmung beim Kaninchen. Die Untersuchungen konnten am vorliegenden Material im Durchschnitt beim 27. Granulozyten mit der Diagnose "weiblich" und beim 60. Granulozyten mit der Diagnose "männlich" abgebrochen werden.

Die Untersuchung des Präparates K-58, des Blutaussstriches eines Kaninchens, dessen äußeres Genitale männlich war, ergibt beim 215. Granulozyten die Diagnose "weiblich". Somit dürfte K-58 zu dem erwarteten Fehlerprozent gehören, es sei denn, es läge ein Pseudohermaphroditismus vor. Dieser Frage konnte leider nicht nachgegangen werden, da das Tier nach Beendigung der Rechenarbeiten nicht mehr zur Verfügung stand. Grundsätzlich ist zu empfehlen, den Befund eines Präparates, dessen Untersuchungslinie sich sehr lange im neutralen Bereich bewegt, vorsichtig zu bewerten.

Tabelle.

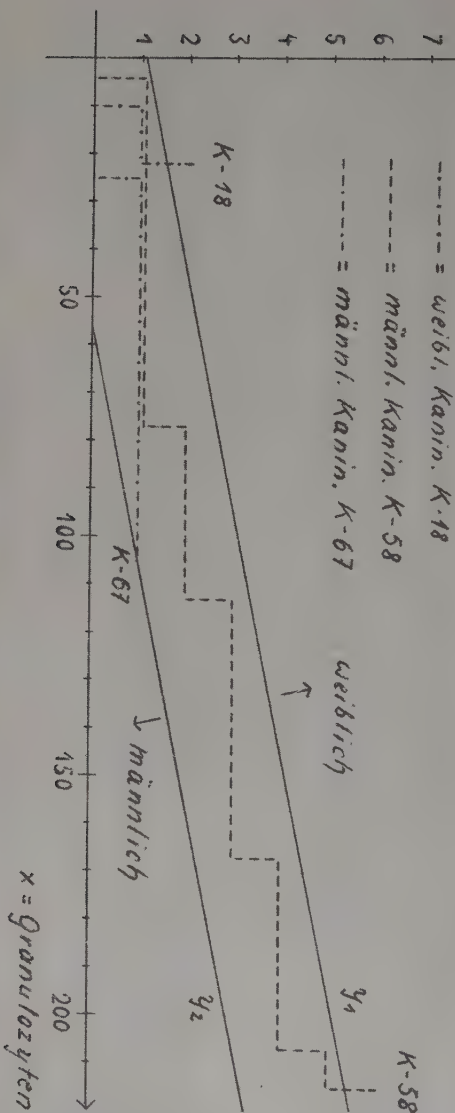
W	Gran. drumst. Befund			M	Gran. drumst. Befund		
K-01	22	2	weibl.	K-51	56	-	männl.
K-02	69	3	"	K-52	56	-	"
K-03	36	2	"	K-53	56	-	"
K-04	13	2	"	K-54	56	-	"
K-05	16	2	"	K-55	56	-	"
K-06	48	3	"	K-56	56	-	"
K-07	53	3	"	K-57	56	-	"
K-08	13	2	"	K-58	215	6	weibl.
K-09	17	2	"	K-59	56	-	männl.
K-10	29	2	"	K-60	56	-	"
K-11	28	2	"	K-61	56	-	"
K-12	28	2	"	K-62	56	-	"
K-13	48	3	"	K-63	56	-	"
K-14	21	2	"	K-64	56	-	"
K-15	2	2	"	K-65	56	-	"
K-16	7	2	"	K-66	56	-	"
K-17	21	2	"	K-67	107	1	"
K-18	22	2	"	K-68	56	-	"
K-19	22	2	"	K-69	56	-	"
K-20	11	2	"	K-70	56	-	"
K-21	12	2	"	K-71	56	-	"
K-22	42	2	"	K-72	107	1	"
K-23	16	2	"	K-73	56	-	"
K-24	38	2	"	K-74	56	-	"
K-25	30	2	"	K-75	56	-	"

Kaninchen - Sequenzanalyse

$y = \text{drumstick}$

$$y_1 = 0,02033x + 1,1075$$

$$y_2 = 0,02033x - 1,1075$$



B) Weiße Ratte.

Die Untersuchungsergebnisse der Ratte lassen bereits auf den ersten Blick einen prägnanten Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Tieren vermissen. Alle Merkmale überschneiden sich weitgehend; zudem fehlt eine klare Gegenläufigkeit zweier Merkmalsgruppen. So erschien von vornherein - wenn überhaupt - die Diskriminanz-Analyse als das einzige statistische Verfahren, mit dessen Hilfe eine Trennformel zu finden war.

Die Diskriminanz-Analyse nach R. A. F i s h e r wird angewendet, wenn zwei oder mehrere Gruppen von Gegenständen durch mehrere, zahlenmäßig erfaßbare Eigenschaften gekennzeichnet sind, ohne daß jeweils eine solche Eigenschaft allein für die eine oder andere Gruppe signifikant ist. In einem solchen Falle ermöglicht es dieses mathematisch-statistische Verfahren, aus den einzelnen Eigenschaftswerten ein gemeinsames Maß in Form einer Trennformel zu gewinnen, mittels dessen die einzelnen Gruppen von Gegenständen auseinandergehalten werden können. Die Frage, ob alle erfaßbaren und zur Verfügung stehenden Eigenschaften in dieses gemeinsame Maß eingehen sollen, wird durch den t-Test beantwortet.

Im vorliegenden Falle ist also zu errechnen, welche von den 5 Merkmalen

- x_1 = drumsticks
- x_2 = sessile nodules
- x_3 = rackets
- x_4 = small clubs
- x_5 = minor lobes

bei der Aufstellung einer linearen Trennformel Verwendung finden sollen und welchen Ausdruck diese vorerst allgemein mit

$$X = a_1 \cdot x_1 + a_2 \cdot x_2 + a_3 \cdot x_3 + a_4 \cdot x_4 + a_5 \cdot x_5$$

zu bezeichnende Trennformel annimmt.

Zunächst werden die arithmetischen Mittelwerte $\bar{x}$ und die Summen der Quadrate der Differenzen zwischen den x_i und den gefundenen Mittelwerten $\bar{x}$ berechnet. Die dazu notwendigen Formeln lauten:

$$\bar{x} = x_0 + \frac{S \cdot d}{N} \quad \text{und}$$

$$S(x_i - \bar{x}_i)^2 = S \cdot d^2 - \frac{(S \cdot d)^2}{N}$$

Tabelle 1 gibt die dabei benötigten x_0 , $S \cdot d$ und $S \cdot d^2$ an. In Tabelle 2 sind die gefundenen Summenwerte und die nach der Formel

$$s = \sqrt{S(x_i - \bar{x}_i)^2 \cdot \frac{1}{N-1}}$$

errechneten Wurzeln der Quadrate der Streuungen der Mittelwerte zusammengestellt, während die gefundenen Mittelwerte in Tabelle 3 aufgeführt sind. In dieser Tabelle finden sich weiterhin die Differenzen der Mittelwerte $d(\bar{x})$, die nach der Gleichung

$$d(\bar{x}) = \bar{x}_M - \bar{x}_W$$

gefunden werden. Ferner enthält Tabelle 3 die Wurzeln der Quadrate der gemeinsamen Streuungen von $\bar{x}_M$ und $\bar{x}_W$, die sich aus der Gleichung

$$s_{MW} = \sqrt{\left[S_M(x_i - \bar{x}_i)^2 + S_W(x_i - \bar{x}_i)^2 \right] \cdot \frac{1}{N_M + N_W - 2}}$$

ergeben. Über die Gleichung

$$t = \frac{d(\bar{x})}{s_{MW}} \cdot \sqrt{\frac{N_M \cdot N_W}{N_M + N_W}}$$

erhalten wir die in der letzten Spalte der Tabelle 3 aufgeführten Werte des ersten t-Testes.

Um eine zu 99,0 % gesicherte Signifikanz eines Merkmals zu erhalten, muß bei einer Anzahl von 50 ausgewerteten Merkmalsträgern der t-Wert des Merkmals 2,678 erreichen. Somit erscheinen x_1 , x_2 und x_4 als signifikant.

Der bisherige Rechenvorgang läßt aber keinerlei Aussage darüber zu, inwieweit ein nach dem vorherigen Ergebnis signifikantes Merkmal in so enger Abhängigkeit zu einem anderen Merkmal steht, daß es nach dem Ausschalten jenes Merkmals allein keine Signifikanz mehr besitzt. Um darüber Auskunft zu erhalten, wird x_1 , welches den höchsten t-Wert ergibt, herausgenommen und die Regression der anderen Maße gegenüber x_1 berechnet.

Für die Regressionsberechnung werden neben den Quadratsummen $S_{MW}(x_i - \bar{x}_i)^2$, die sich aus den Werten der Tabelle 2 addieren lassen, die Produktsummen $S_{MW}(x_i - \bar{x}_i)(x_{t1} - \bar{x}_{t1})$ benötigt, wobei

$x_{t1} = x_1$ ist. Tabelle 4 nennt die einzelnen Produktsummen für das weibliche und für das männliche Geschlecht, während Tabelle 5 die gemeinsamen Quadratsummen und die gemeinsamen Produktsummen angibt. Aus diesen Summen werden die Regressionskoeffizienten $b_{i/t1}$ nach der Formel

$$b_{i/t1} = \frac{S_{MW}(x_i - \bar{x}_i)(x_{t1} - \bar{x}_{t1})}{S_{MW}(x_{t1} - \bar{x}_{t1})^2}$$

errechnet. Diese sind in Tabelle 6 aufgeführt. Tabelle 6 enthält weiterhin die Unterschiede U_i zwischen den einzelnen Gruppendurchschnitten und den entsprechenden Regressionswerten, die aus der Gleichung

$$U_i = d(\bar{x}_i) - b_{i/t1} \cdot d(\bar{x}_{t1})$$

gefunden werden, sowie die Wurzeln der einzelnen Summen der Quadrate der Abweichungen um die Regressionsgerade, für welche die Gleichung

$$s_r = \sqrt{\frac{S_{MW}(x_i - \bar{x}_i)^2 - b_{i/t1} \cdot S_{MW}(x_i - \bar{x}_i)(x_{t1} - \bar{x}_{t1})}{N_M + N_W - 3}}$$

bestimmend ist. Für die Werte des zweiten t-Testes gilt dann

$$t_2 = \frac{U_i}{s_r} \cdot \sqrt{\frac{N_M \cdot N_W}{N_M + N_W}}$$

Diese Werte sind ebenfalls in Tabelle 6 genannt.

Nach dem zweiten t-Test zeigen sich erneut die Merkmale x_2 und x_4 signifikant. Dabei ist allerdings eine gewisse Abhängigkeit zwischen x_2 und x_1 feststellbar; denn im Gegensatz zum ersten t-Test hat nun x_4 den höheren Wert. x_4 wird daher herausgenommen und die Regression gegenüber x_4 festgestellt. Da die Merkmale x_3 (rackets) und x_5 (minor lobes) beim ersten wie beim zweiten t-Test nicht signifikant gewesen sind und vorkommensmäßig kaum ins Gewicht fallen, können diese beiden Merkmale bei den folgenden Rechnungen übergangen werden. Dadurch wird der Rechenvorgang vereinfacht.

In der Berechnung der zweiten Regression werden zunächst wie-

derum die Quadratsummen $S_{MW}(x_1 - \bar{x}_1)^2$ und die Produktsummen $S_{MW}(x_1 - \bar{x}_1)(x_{t2} - \bar{x}_{t2})$ zusammengestellt. Dabei ist $x_{t2} = x_4$. Die Tabelle 7 enthält die einzelnen Produktsummen für das weibliche und für das männliche Geschlecht, Tabelle 8 die gemeinsamen Quadratsummen und die gemeinsamen Produktsummen. Nunmehr sind wieder die Regressionskoeffizienten zu bestimmen, welche durch die Gleichungen

$$b_{i \cdot t1/t2} \cdot S_{MW}(x_{t1} - \bar{x}_{t1})^2 + b_{i \cdot t2/t1} \cdot S_{MW}(x_{t1} - \bar{x}_{t1}) \cdot (x_{t2} - \bar{x}_{t2}) = S_{MW}(x_{t1} - \bar{x}_{t1})(x_1 - \bar{x}_1)$$

und

$$b_{i \cdot t1/t2} \cdot S_{MW}(x_{t1} - \bar{x}_{t1})(x_{t2} - \bar{x}_{t2}) + b_{i \cdot t2/t1} \cdot S_{MW}(x_{t2} - \bar{x}_{t2})^2 = S_{MW}(x_{t2} - \bar{x}_{t2})(x_1 - \bar{x}_1)$$

gegeben sind. Um den Rechenvorgang zu vereinfachen, werden $b_{i \cdot t1/t2}$ und $b_{i \cdot t2/t1}$ nicht aus obigen Gleichungen berechnet, sondern es werden die Multiplikatoren $c_{t1/t1}$, $c_{t1/t2} = c_{t2/t1}$ und $c_{t2/t2}$ eingeführt. Für diese Multiplikatoren gelten die Gleichungssysteme

$$S_{MW}(x_{t1} - \bar{x}_{t1})^2 \cdot c_{t1/t1} + S_{MW}(x_{t1} - \bar{x}_{t1})(x_{t2} - \bar{x}_{t2}) \cdot c_{t1/t2} = 1$$

$$S_{MW}(x_{t1} - \bar{x}_{t1})(x_{t2} - \bar{x}_{t2}) \cdot c_{t1/t1} + S_{MW}(x_{t2} - \bar{x}_{t2})^2 \cdot c_{t1/t2} = 0$$

und

$$S_{MW}(x_{t1} - \bar{x}_{t1})^2 \cdot c_{t2/t1} + S_{MW}(x_{t1} - \bar{x}_{t1})(x_{t2} - \bar{x}_{t2}) \cdot c_{t2/t2} = 0$$

$$S_{MW}(x_{t1} - \bar{x}_{t1})(x_{t2} - \bar{x}_{t2}) \cdot c_{t2/t1} + S_{MW}(x_{t2} - \bar{x}_{t2})^2 \cdot c_{t2/t2} = 1$$

In Tabelle 9 sind die gefundenen Werte der Multiplikatoren aufgeführt. Mit Hilfe der Multiplikatoren werden nun die Regressionskoeffizienten aus folgenden Gleichungen bestimmt:

$$b_{i \cdot t1/t2} = c_{t1/t1} \cdot S_{MW}(x_{t1} - \bar{x}_{t1})(x_1 - \bar{x}_1) + c_{t1/t2} \cdot S_{MW}(x_{t2} - \bar{x}_{t2})(x_1 - \bar{x}_1)$$

und

$$b_{1 \cdot t2/t1} = c_{t2/t1} \cdot S_{MW}(x_{t1} - \bar{x}_{t1})(x_i - \bar{x}_i) + \\ + c_{t2/t2} \cdot S_{MW}(x_{t2} - \bar{x}_{t2})(x_i - \bar{x}_i) .$$

Nach dem Erhalt von b werden der Unterschied U_2 aus der Gleichung

$$U_{12} = d(\bar{x}_i) - b_{1 \cdot t1/t2} \cdot d(\bar{x}_{t1}) - b_{1 \cdot t2/t1} \cdot d(\bar{x}_{t2})$$

und die Wurzel der Summe der Quadrate der Abweichungen von der zweiten Regressionsgeraden aus der Gleichung

$$s_{r2} = \sqrt{\frac{S_{MW}(x_i - \bar{x}_i)^2 - b_{1 \cdot t1/t2} \cdot S_{MW}(x_{t1} - \bar{x}_{t1}) \cdot \\ \cdot (x_i - \bar{x}_i) - b_{1 \cdot t2/t1} \cdot S_{MW}(x_{t2} - \bar{x}_{t2}) \cdot \\ \cdot (x_i - \bar{x}_i)}{N_M + N_W - 4}}$$

errechnet. Nunmehr kann t_3 gefunden werden, denn es ist

$$t_3 = \frac{U_2}{s_{r2}} \cdot \sqrt{\frac{N_M \cdot N_W}{N_M + N_W}} .$$

Die Werte für b, U, s und t der zweiten Regression sind in Tabelle 10 genannt. Da der t-Wert für das Merkmal x_2 abermals signifikant ist, sind nun die Merkmale ermittelt, welche in die Trennformel einzubeziehen sind. Diese lautet somit

$$X = a_1 \cdot x_1 + a_2 \cdot x_2 + a_4 \cdot x_4 .$$

Die Bestimmung der drei Unbekannten a_1 , a_2 und a_4 geschieht mittels dreier Gleichungen:

$$a_1 \cdot S_{MW}(x_1 - \bar{x}_1)^2 + a_2 \cdot S_{MW}(x_2 - \bar{x}_2)(x_1 - \bar{x}_1) + \\ + a_4 \cdot S_{MW}(x_4 - \bar{x}_4)(x_1 - \bar{x}_1) = d(\bar{x}_1)$$

$$a_1 \cdot S_{MW}(x_1 - \bar{x}_1)(x_2 - \bar{x}_2) + a_2 \cdot S_{MW}(x_2 - \bar{x}_2)^2 + \\ + a_4 \cdot S_{MW}(x_4 - \bar{x}_4)(x_2 - \bar{x}_2) = d(\bar{x}_2)$$

und

$$a_1 \cdot S_{MW}(x_1 - \bar{x}_1)(x_4 - \bar{x}_4) + a_2 \cdot S_{MW}(x_2 - \bar{x}_2)(x_4 - \bar{x}_4) + \\ + a_4 \cdot S_{MW}(x_4 - \bar{x}_4)^2 = d(\bar{x}_4) .$$

Die so erhaltenen Faktoren der Tabelle 11 werden schließlich durch a_1 dividiert, so daß die Trennformel

$$X = -x_1 - 0,0583 x_2 + 0,0336 x_4$$

lautet. Diese Trennformel kann noch dahin transformiert werden, daß die Trenngrenze bei $x = 0$ liegt, während sie nach obiger Formel in einem Punkte P zwischen $\bar{X}_W$ und $\bar{X}_M$ auftritt. Dieser Punkt P, der durch die Gleichungen

$$P = \bar{X}_M + b \quad \text{und}$$

$$P = \bar{X}_W - a$$

festgelegt ist, ist zu suchen. In Tabelle 12 ist die nicht-transformierte Trennformel zur Anwendung gekommen. Tabelle 13 gibt die aus den Summen der X von Tabelle 12 erhaltenen Mittelwerte $\bar{X}_M$ und $\bar{X}_W$, die Summen der Quadrate der Differenzen zwischen den X_1 und den $\bar{X}$ sowie die nach der Formel

$$s_A = \sqrt{\frac{S.d^2}{N}}$$

gefundenen Wurzeln der Quadrate der Streuungen an. Da nun einerseits

$$a + b = \bar{X}_W - \bar{X}_M$$

ist, andererseits sich

$$a : b = s_{AW} : s_{AM}$$

verhält, ist Punkt P leicht zu finden. Tabelle 14 enthält die gefundenen Werte für a, b und P. Um diesen Wert P ist die Trennformel zu transformieren, so daß sie die endgültige Formulierung

$$X_{Alt} = -x_1 - 0,0583 x_2 + 0,0336 x_4 + 3,21$$

$$- X \langle 0 = \text{weiblich} ; X \rangle 0 = \text{männlich} -$$

erhält. Tabelle 15 gibt schließlich die X_{Alt} für die untersuchten Ratten an.

Das weibliche Präparat R-14 zeigt einen männlichen und die männlichen Präparate R-61 und R-63 zeigen weibliche Werte. Die Fehlerquote beträgt im untersuchten Material somit 6 %. Damit liegt die Sicherheit der Aussage unter den für biologische Tests meist geforderten 95 %. Immerhin gelingt in einem sehr hohen Prozentsatz eine richtige Geschlechtsdiagnose mit Hilfe der Diskrimi-

nanz-Analyse.

Eine Verkürzung der Zählerarbeit ist nicht möglich, da eine geringere Anzahl untersuchter Leukozyten die Fehlerquote noch erhöhen würde.

Erklärungen zu den Tabellen auf den folgenden Seiten:

x_1 = drumsticks
 x_2 = sessile nodules
 x_3 = rackets
 x_4 = small clubs
 x_5 = minor lobes

Fußnote $_W$ (z.B. s_W) = weibliche Ratten
Fußnote $_M$ (z.B. s_M) = männliche Ratten

x_1 in den Tabellen 4 und 5 = x_{t1}
 $b_{i/1}$ in Tabelle 6 = $b_{i/t1}$

x_4 in den Tabellen 7 und 8 = x_{t2}
 $c_{1/1}$, $c_{1/4}$, $c_{4/1}$ und $c_{4/4}$ in Tabelle 9 = $c_{t1/t1}$, $c_{t1/t2}$,
 $c_{t2/t1}$ und $c_{t2/t2}$
 $b_{i.1/4}$ und $b_{i.4/1}$ in Tabelle 10 = $b_{i.t1/t2}$ und $b_{i.t2/t1}$.

Tabelle 1.

x_i	x_{OW}	Sd_W	Sd_W^2	x_{OM}	Sd_M	Sd_M^2
x_1	8	-13	233	3	10	58
x_2	15	44	844	8	9	419
x_3	0	4	4	0	5	5
x_4	30	81	3405	50	115	2972
x_5	3	12	132	2	12	70

Tabelle 2.

x_i	$S_W(x_i - \bar{x}_i)^2$	$s_W(\bar{x}_i)$	$S_M(x_i - \bar{x}_i)^2$	$s_M(\bar{x}_i)$
x_1	266,24	3,07	54,00	1,50
x_2	766,56	5,65	415,76	4,16
x_3	3,36	0,37	4,00	0,41
x_4	3142,56	11,44	2443,00	10,09
x_5	129,24	2,32	64,24	1,64

Tabelle 3.

x_i	$\bar{x}_M$	$\bar{x}_W$	$d(\bar{x})$	s_{MW}	t_1
x_1	2,60	7,48	-4,88	2,42	-7,14
x_2	8,36	16,76	-8,40	4,96	-5,99
x_3	0,20	0,16	0,04	0,39	0,36
x_4	45,40	33,24	12,16	10,79	3,98
x_5	1,52	2,52	-1,00	2,01	-1,76

Tabelle 4.

x_i	$S_W(x_i - \bar{x}_i)(x_1 - \bar{x}_1)$	$S_M(x_i - \bar{x}_i)(x_1 - \bar{x}_1)$
x_1	266,24	54,00
x_2	258,88	-7,10
x_3	-3,92	2,00
x_4	163,12	147,00
x_5	20,86	1,20

Tabelle 5.

x_i	$S_{MW}(x_i - \bar{x}_i)^2$	$S_{MW}(x_i - \bar{x}_i)(x_1 - \bar{x}_1)$
x_1	280,24	280,24
x_2	1182,32	251,78
x_3	7,36	-1,92
x_4	5585,56	310,12
x_5	193,48	22,06

Tabelle 6.

x_i	$b_{1/1}$	U_i	s_r	t_2
x_1	1,000 000	-	-	-
x_2	0,898 444	-4,015 593	4,51	-3,15
x_3	-0,006 851	0,006 567	0,40	0,06
x_4	1,106 623	17,560 320	10,56	5,88
x_5	0,078 718	-0,615 856	2,02	-1,08

Tabelle 7.

x_i	$S_W(x_i - \bar{x}_i)(x_4 - \bar{x}_4)$	$S_M(x_i - \bar{x}_i)(x_4 - \bar{x}_4)$
x_1	163,12	147,00
x_2	687,44	570,40
x_4	3142,56	2443,00

Tabelle 8.

x_i	$S_{MW}(x_i - \bar{x}_i)^2$	$S_{MW}(x_i - \bar{x}_i)(x_4 - \bar{x}_4)$
x_1	280,24	310,12
x_2	1182,32	1257,84
x_4	5585,56	5585,56

Tabelle 9.

$$\begin{aligned}
 c_{1/1} &= 0,003 \ 8017 \\
 c_{1/4} &= -0,000 \ 2117 \\
 c_{4/1} &= -0,000 \ 2117 \\
 c_{4/4} &= 0,000 \ 1907
 \end{aligned}$$

Tabelle 10.

x_i	$b_{i \cdot 1/4}$	$b_{i \cdot 4/1}$	U_2	s_{r2}	t_3
x_2	0,6908	0,2345	-7,8804	3,94	-7,01
x_4	1,0000	1,0000	-	-	-

Tabelle 11.

siehe Seite 30.

Tabelle 12.

W	X	M	X
R-01	-7,21	R-51	-2,43
R-02	-8,37	R-52	0,17
R-03	-7,21	R-53	-1,36
R-04	-6,51	R-54	-0,73
R-05	-8,06	R-55	-1,93
R-06	-10,79	R-56	-3,17
R-07	-13,82	R-57	-2,15
R-08	-16,24	R-58	-0,59
R-09	-8,03	R-59	-1,52
R-10	-9,30	R-60	-0,84
R-11	-7,03	R-61	-4,86
R-12	-6,88	R-62	-1,00
R-13	-8,22	R-63	-5,53
R-14	-2,01	R-64	-1,07
R-15	-3,70	R-65	-2,43
R-16	-4,21	R-66	-0,64
R-17	-5,68	R-67	-2,23
R-18	-4,93	R-68	-1,11
R-19	-10,30	R-69	-0,34
R-20	-3,81	R-70	-1,99
R-21	-4,68	R-71	-0,15
R-22	-5,91	R-72	0,01
R-23	-4,59	R-73	-1,37
R-24	-5,82	R-74	-0,95
R-25	-10,18	R-75	0,14
$S(X_W) =$	-183,49	$S(X_M) =$	-35,07

Tabelle 11.

$$\begin{aligned} a_1 &= -0,1462 \ 2 \\ a_2 &= -0,0085 \ 22 \\ a_4 &= 0,0049 \ 08 \end{aligned}$$

Tabelle 13.

	$\bar{X}$	Sd^2	s_A
W	-7,34	249,096	3,16
M	-1,40	48,231	1,39

Tabelle 14.

a	b	P
4,13	1,81	3,21

Endgültige Trennformel.

$$X_{Alt} = -x_1 - 0,0583 x_2 + 0,0336 x_4 + 3,21$$

- $X < 0$ = weiblich ; $X > 0$ = männlich -

Tabelle 15.

W	X_{Alt}	M	X_{Alt}
R-01	-4,00	R-51	0,78
R-02	-5,16	R-52	3,38
R-03	-4,00	R-53	1,85
R-04	-3,30	R-54	2,48
R-05	-4,85	R-55	1,28
R-06	-7,58	R-56	0,04
R-07	-10,61	R-57	1,06
R-08	-13,03	R-58	2,62
R-09	-4,82	R-59	1,69
R-10	-6,09	R-60	2,37
R-11	-3,82	R-61	-1,65
R-12	-3,67	R-62	2,21
R-13	-5,01	R-63	-2,32
R-14	1,20	R-64	2,14
R-15	-0,49	R-65	0,78
R-16	-1,00	R-66	2,57
R-17	-2,47	R-67	0,98
R-18	-1,72	R-68	2,10
R-19	-7,09	R-69	2,87
R-20	-0,60	R-70	1,22
R-21	-1,47	R-71	3,06
R-22	-2,70	R-72	3,22
R-23	-1,38	R-73	1,84
R-24	-2,61	R-74	2,26
R-25	-6,97	R-75	3,35

VI. SCHLUSSBETRACHTUNG.

A) Kaninchen.

Die hämatologische Geschlechtsbestimmung beim Kaninchen bereitet keine Schwierigkeiten. Allein aus der Anzahl der bei der Untersuchung von 500 segmentkernigen neutrophilen Granulozyten je Tier gefundenen "drumsticks" kann eine eindeutige Diagnose gestellt werden.

Die in dieser Arbeit angewendete Sequenz-Analyse erlaubt es darüber hinaus, den Aufwand an Zählarbeit auf einen sehr niedrigen Wert herabzusetzen, ohne daß dabei die gewünschte Sicherheit vermindert wird. Das ist möglich, weil bei der Anwendung dieses statistischen Verfahrens der Fortgang der Untersuchung laufend beobachtet und diese in dem Augenblick abgeschlossen wird, in welchem die Entscheidung zugunsten einer der beiden Geschlechtsmöglichkeiten gefallen ist. Am vorliegenden Material konnte bei einer Fehlerquote von 1 % durchschnittlich bereits nach dem 27. untersuchten Granulozyten die Diagnose "Weibliches Kaninchen" und nach dem 60. Granulozyten die Diagnose "Männliches Kaninchen" gestellt werden.

B) Weiße Ratte.

Die Beurteilung der Kernexkreszenzen der segmentkernigen neutrophilen Granulozyten der Ratte ging davon aus, daß bei diesem Tier "drumsticks" in Form der "Ratten-drumsticks" vorhanden sind. Es erhebt sich die Frage, ob diese Annahme, die sich im Gegensatz zu den Beurteilungsverfahren anderer Autoren befindet, zu Recht besteht.

Th. und H. L ü e r s haben einen "drumstick" in der menschlichen Größenordnung gesehen. Ich selbst sah typische "Chromatinmassen" in Vaginalepithelzellen. M o o r e und B a r r berichten, daß sie unter je 500 Nervenzellen zweier Ratten ein oder zwei Chromatinmassen gesehen haben, die aber kleiner als bei den übrigen Tiergattungen waren. Bei meinen Untersuchungen von Rattenblutausstrichen schließlich wurden Anhangsgebilde, die

etwa 0,5 bis 1,0 my groß, also kleiner als die "drumsticks" des Menschen und des Kaninchens sind, als "Ratten-drumsticks" gewertet. Entsprechend verändert waren die Größen der übrigen vier Anhangsgruppen. Das Ergebnis meiner Arbeit scheint dieser Neueinteilung der Ratten-Kernexkreszenzen Recht zu geben. Denn während bislang eine hämatologische Geschlechtsdiagnose bei diesem Nager nicht möglich war, gelang es nun, auf Grund der neuen Einteilung mit Hilfe der Diskriminanz-Analyse eine Trennformel zu finden, deren Anwendung bei 96 % der von mir untersuchten Tiere, also in den weitaus meisten Fällen, eine richtige Geschlechtsdiagnose gestattet.

Bei einer endgültigen Klärung dieses Problems dürfte die Frage nach dem Wesen der "drumsticks" eine große Rolle spielen. Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß schon B a r r und seine Mitarbeiter angenommen hatten, die Nukleolus-Satelliten seien eine Manifestation der XX-Chromosomen des weiblichen Geschlechtes. Dieser Auffassung wurde in den folgenden Jahren allgemeine Zustimmung zuteil. Allerdings wurde schon bald darauf aufmerksam gemacht, daß dieses Geschlechtschromatin beim männlichen Geschlecht nicht vorkommen dürfte, wenn man die "Geschlechtskörperchen" nur als XX-Chromosomen ansehen wollte. D a v i d s o n und S m i t h glaubten daher zunächst, daß ihre "drumsticks", die sie ebenfalls als Ausdruck der XX-Chromosomen ansahen, nur beim weiblichen Geschlecht vorkämen. In Kapitel I wurde schon erwähnt, daß die B a r r 'sche Theorie von M a r b e r g e r und N e l s o n sowie von zahlreichen anderen Forschern dahingehend abgeändert wurde, daß man das Geschlechtschromatin, also die "nucleolar satellites" von B a r r und zunächst auch die "drumsticks" von D a v i d s o n und S m i t h einerseits als Formation der XX-Chromosomen, zum anderen aber auch als - wenn auch seltener vorkommende - Formation eines "Äquivalents" ansah. Demnach sind die Nukleolus-Satelliten (und wären es auch die Trommelschlegel) beim weiblichen Geschlecht zum größeren Teil echtes Geschlechtschromatin, zum kleineren Teil "Äquivalent"-Chromatin, während sie beim männlichen Geschlecht nur Ausdruck dieses Äquivalents sind. Bezüglich der "drumsticks" machte aber A s h l e y 1957 eine bedeutsame Feststellung. Er un-

tersuchte 25 neutrophile Granulozyten menschlicher Herkunft, die einen "drumstick" trugen, näher. Bei sechs dieser Zellen nun sah A s h l e y außer dem "drumstick" als Kernexkreszenz je einen typischen Chromatinkörper im Sinne des "nucleolar satellite" von B a r r im Innern des Zellkernes. Dieser Fund läßt es als sehr unwahrscheinlich gelten, daß die "drumsticks" eine direkte Formation der XX-Chromosomen sind. Andererseits ist eine Geschlechtsabhängigkeit der "drumsticks" auf Grund der zahlenmäßigen Befunde und der daraus ermöglichten Aussagen unbedingt anzunehmen. B o h l e und H i e n z warfen bereits 1956 die Frage auf, ob die "drumsticks" nicht auch ein sekundäres oder tertiäres Geschlechtsmerkmal, so zum Beispiel der morphologische Ausdruck eines geschlechtlich verschiedenen Zellstoffwechselgeschehens sein könnten. Nach der Entdeckung A s h l e y s ist dieser Frage zweifellos große Bedeutung beizumessen.

Wenn der "drumstick" aber nicht direkt den XX-Chromosomen entspricht, erscheint die Forderung nach einer bestimmten, den XX-Chromosomen der betreffenden Tiergattung entsprechenden Größe nicht mehr notwendig. Denn die Zellfunktion einer weiblichen Ratte könnte schon weibliche "drumsticks" in einer ganz anderen Größenordnung bewirken als beispielsweise beim Kaninchen oder der Frau.

VII. ZUSAMMENFASSUNG.

Es werden von je 25 Blutausstrichen weiblicher und männlicher Kaninchen und Ratten je 500 segmentkernige neutrophile Granulozyten auf das Vorhandensein von Geschlechtsunterschieden untersucht.

A) Kaninchen.

Beim Kaninchen gelingt mit Hilfe der Sequenz-Analyse eine rasche und sichere Geschlechtsdiagnose aus dem Blutbild. Es werden lediglich eindeutige "drumsticks" - das sind vorwiegend

beim weiblichen Geschlecht vorkommende, charakteristische Kernanhangskörperchen in der Größenordnung 1,0 bis 1,5 my - gezählt. Zur Diagnosestellung mit einer Sicherheit von 99 % genügt es, im Durchschnitt 44 segmentkernige neutrophile Granulozyten zu untersuchen, während bei der bisher üblich gewesenen, nicht statistisch untermauerten Beurteilung die genaue Betrachtung von mehreren Hundert Granulozyten je Tier notwendig war.

B) Weiße Ratte.

Für die Weiße Ratte wird eine neue Einteilung der vorhandenen Kernanhänge gegeben. Danach werden Gebilde, die eine Größe von etwa 0,5 bis 1,0 my besitzen, im übrigen aber den Anforderungen an einen typischen "drumstick" entsprechen, als "Ratten-drumsticks" gewertet. Auf Grund dieser Neueinteilung ermöglicht die Diskriminanz-Analyse die Aufstellung einer Trennformel, deren Anwendung bei 96 % der untersuchten Ratten eine richtige Geschlechtsdiagnose aus dem Blutbild ergibt, während bislang eine hämatologische Geschlechtserkennung bei der Weißen Ratte als undurchführbar angesehen wurde.

Die Problematik der vom klassischen Einteilungsschema abweichenden Anhangskörperchen-Einteilung wird besprochen.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS.

1. Ashley, D.J.B.: Nature (Lond.) 179, 969 (1957).
2. Barr, M.L.: Anat. Rec. 118, 280 (1954).
3. Barr, M.L. and E.G. Bertram: Nature (Lond.) 163, 676 (1949).
4. Barr, M.L. and E.G. Bertram: J. Anatom. 85, 171 (1951).
5. Barr, M.L., E.G. Bertram and H.A. Lindsay: Anat. Rec. 107, 283 (1950).
6. Bohle, A. und H.A. Hienz: Klin. Wschr. 34, 981 (1956).
7. Brusa, A.: Anat. Anz. 98, 343 (1952).
8. Burlington, H.: Exptl. Cell Research 16, 219 (1959).
9. Davidson, W.M. and D.R. Smith: Brit. Med. J. 4880, 6 (1954).
10. Dihlmann, W.: Folia haemat. 75, 121 (1958).
11. Dihlmann, W.: Folia haemat. 75, 289 (1958).
12. Dixon, A.D. and J.B. Torr: Nature (Lond.) 178, 797 (1956).
13. von Harnack, G.-A. und H.-N. Strietzel: Klin. Wschr. 34, 401 (1956).
14. Koller, P.Ch. and C.D. Darlington: Journ. Gen. 29, 159 (1934).
15. Kosenow, W.: Ärztl. Wschr. 11, 320 (1956).
16. Kosenow, W., M. Glörfeld und U.E. Hellmann: Klin. Wschr. 35, 826 (1957).
17. Kosenow, W. und R. Scupin: Klin. Wschr. 34, 51 (1956).

18. Kraft, H.: Blut III, 344 (1957).
19. Kraft, H.: Blut VI, 18 (1960).
20. Krueger, W.-D. und W. Dihlmann: Klin. Wschr. 35, 1047 (1957).
21. Linder, A.: Statistische Methoden, 2. Aufl. Basel: Birkhäuser 1957.
22. Lindsay, H.A. and M.L. Barr: J. Anatom. 89, 47 (1955).
23. Lüers, Th.: Blut II, 81 (1956).
24. Lüers, Th. und H. Lüers: Zool. Anz. 160, 248 (1958).
25. Malkowski, E.L., K.A. Prem and J.H. Kaiser: Science 123, 542 (1956).
26. Merberger, E. und W. Nelson: Bruns Beitr. 190, 103 (1955).
27. Moore, K.L. and M.L. Barr: J. Comp. Neurol. 98, 213 (1953).
28. Moore, K.L. and M.L. Barr: Acta Anat. 21, 197 (1954).
29. Moore, K.L. and M.L. Barr: Lancet 1955/II, 57 (1955).
30. Orsi, E.V. and H.B. Ritter: Exptl. Cell Research 15, 244 (1958).
31. Plate, L.: Vererbungslehre, 2. Aufl. Jena: Fischer 1932.
32. Porter, K.A.: Nature (Lond.) 179, 784 (1957).
33. Ruhren, R.: Exptl. Cell Research 19, 424 (1960).
34. Sachs, L., D.M. Serr and M. Danon: Science 123, 548 (1956).

35. Sandkühler, St.: Taschenbuch der klinischen Blutmorphologie S. 32
Stuttgart: Enke 1949.
36. Schilling, V.: Praktische Blutlehre, 14. Aufl.
Jena: Fischer 1949.
37. Schleip, K. und A. Alder: Atlas der Blutkrankheiten,
4. Aufl. S. 180
Berlin und München: Urban und Schwarzenberg 1949.
38. Schröder, L.: Mhft. Vet. Med. Sonderheft
S. 89 (1959).
39. Strietzel, H.-N.: Med. Diss. Hamburg (1955).
40. Tolksdorf, M., H. Romatowski,
M. Saile und H.-R. Wiedemann: Ärztl. Wschr. 10, 1029 (1955).
41. Wiedemann, H.-R., H. Romatowski,
M. Tolksdorf und F.R. Prediger: Die Medizin. 16, 631 (1956).
42. Zaoralek, P.: Schweiz. Arch. Tierhkde. 101,
502 (1959).

Lebenslauf.

Am 27. März 1935 wurde ich, Manfred Xaver Wilhelm Geßler, als erster Sohn des Tierarztes Dr. Sebastian Geßler und seiner Ehefrau Martha geb. Rauscher in Zwickau geboren. Meine Kindheit verlebte ich in Langenbernsdorf Kreis Werdau/Sachsen, dem Wohnort meiner Eltern. Dort besuchte ich von 1941 bis 1946 die Volksschule. Seit Herbst 1946 war ich Schüler des humanistischen Domgymnasiums in Fulda, wo ich am 1. März 1955 die Reifeprüfung ablegte. Im Sommersemester 1955 immatrikulierte ich mich an der damaligen Justus Liebig-Hochschule in Gießen für das Studienfach Veterinärmedizin. Am 24. April 1957 bestand ich in Gießen die Tierärztliche Vorprüfung und am 2. Februar 1960 - ebenfalls in Gießen - die Tierärztliche Prüfung. Nach dem Schlußexamen brachte ich meine Dissertationsarbeit zu Ende.

Seit Juli 1960 bin ich in Lindlar bei Köln als Veterinärpraktikant tätig.



Es ist mir ein aufrichtiges Bedürf-
nis, Herrn Professor Dr. Ing. Dr. W.
B o g u t h für die Überlassung des
Themas und seine jederzeit mir wohl-
wollende Förderung bei der Anferti-
gung der vorliegenden Dissertation
herzlich zu danken.

